

SIMPLE IMMUNOCHEMICAL SEMIQUANTITATIVE ASSAY METHOD AND APPARATUS

Patent Number: EP0702233, A4

Publication date: 1996-03-20

Inventor(s): MANITA HIDEAKI (JP)

Applicant(s): TEIKOKU HORMONE MFG CO LTD (JP)

Requested Patent: JP6341989

Application Number: EP19940916429 19940531

Priority Number(s): WO1994JP00875 19940531; JP19930131590 19930602

IPC Classification: G01N33/543

EC Classification: G01N33/543B, G01N33/558

Equivalents: AU6816694, AU693095, CA2163895, US6177281, WO9428415

Abstract

Simple chromatographic immunochemical assay method and apparatus, characterized by reducing the concentration of an object present in a sample before the immunochemical qualitative analysis thereof by trapping the object in such an amount as to correspond to the amount of an antibody against the object, said antibody having been immobilized in a predetermined amount. 

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-341989

(43) 公開日 平成6年(1994)12月13日

(51) Int.Cl.⁵
G 0 1 N 33/543

識別記号
P 8310-2 J
A 8310-2 J

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数10 O.L (全26頁)

(21) 出願番号

特願平5-131590

(22) 出願日

平成5年(1993)6月2日

(71) 出願人 000002990

帝国臓器製薬株式会社

東京都港区赤坂2丁目5番1号

(72) 発明者 真仁田 英明

神奈川県相模原市御園1-11-20

(74) 代理人 弁理士 中村 静男 (外2名)

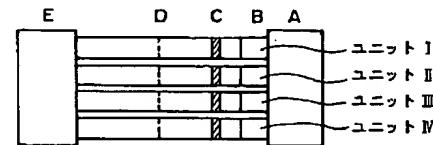
(54) 【発明の名称】 免疫化学的簡易半定量方法および装置

(57) 【要約】

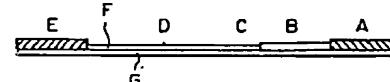
【目的】 試料の希釈を必要とせず、しかも、希釈効果の調整が容易であり、感度良く、即ち半定量値幅を狭く設定することができる簡易な免疫化学的半定量方法および装置を提供する。

【構成】 クロマト法による免疫化学的簡易アッセイにおいて、分析対象物の定性分析の前に、所定量で固定化されて存在する分析対象物に対する抗体により、固定化された抗体量に対応する試料中の分析対象物の一定量を捕捉し、免疫化学的定性分析に付される分析対象物濃度を減少させることを特徴とする免疫化学的簡易半定量方法および装置。

(a)



(b)



A: 試料添加部
B: 抗体固定部
C: 標識物質存在部
D: 検出部
E: 吸収部
F: クロマト材
G: 支持体

【特許請求の範囲】

【請求項1】 クロマト法による免疫化学的簡易アッセイにおいて、分析対象物の定性分析の前に、所定量で固定化されて存在する分析対象物に対する抗体により、固定化された抗体量に対応する試料中の分析対象物の一定量を捕捉し、免疫化学的定性分析に付される分析対象物濃度を減少させることを特徴とする免疫化学的簡易半定量方法。

【請求項2】 分析対象物が完全抗原およびハブテンからなる群から選ばれる請求項1に記載の方法。

【請求項3】 分析対象物がhCG、hLHまたはエストロゲンである請求項1記載の方法。

【請求項4】 分析対象物を含む試料を添加するための試料添加部(A)、試料中の分析対象物の一定量を捕捉する抗体が所定量で固定化されて存在する抗体固定部(B)、分析対象物の存在の有無を検出するための指標となる標識物質がクロマト移動しうる状態で存在する標識物質存在部(C)、標識物質を検出するための検出用物質が固定化されて存在する検出部(D)および添加された試料とともに分析対象物の有無の検出に関与しない標識物質を吸収除去する吸収部(E)からなるイムノクロマト法による免疫化学的簡易半定量装置。

【請求項5】 分析対象物が完全抗原であり、標識物質が抗体固定部(B)に存在する固定化された分析対象物捕捉用抗体(以下、捕捉用抗体Iと略す)とは異なる分析対象物上の抗原決定基を認識する標識された抗体(以下、標識抗体IIと略す)であり、検出用物質が少なくとも標識抗体IIとは異なる分析対象物上の抗原決定基を認識する抗体(以下、検出用抗体IIIと略す)である請求項4に記載の装置。

【請求項6】 分析対象物がハブテンであり、抗体固定部(B)に存在する固定化された分析対象物捕捉用抗体がハブテン抗体(以下、捕捉用抗体IVと略す)であり、検出用物質が分析対象物と結合し得るハブテン抗体(以下、検出用抗体Vと略す)であり、標識物質が分析対象物と競合的に検出用抗体Vと結合しうる標識された物質である請求項4に記載の装置。

【請求項7】 分析対象物がハブテンであり、抗体固定部(B)に存在する固定化された分析対象物捕捉用抗体がハブテン抗体(以下、捕捉用抗体VIと略す)であり、標識物質が分析対象物と結合し得る標識されたハブテン抗体(以下、標識抗体VIIと略す)であり、検出用物質が標識抗体VIIに対して分析対象物であるハブテンと競合的に結合しうる物質である請求項4に記載の装置。

【請求項8】 分析対象物がhCGである請求項5記載の装置。

【請求項9】 分析対象物がhLHである請求項5記載の装置。

【請求項10】 分析対象物がエストロゲンである請求項6記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、分析対象物を含む試料を希釈することなく、簡易に半定量を行なうことができる免疫化学的方法および装置に関する。

【0002】

【先行技術】血液、尿等の生体試料中に含まれる微量物質の定性または定量方法として、その感度の高さから免疫学的測定方法が汎用されている。その手法の内、クロマトグラフィーを用いたいわゆるイムノクロマト法は、操作が簡単であり、検定に要する時間も短いため、現在多くの場面、例えば病院における臨床検査、研究室における検定試験等に広く使われている。

【0003】イムノクロマト法における目的物の検出方法としては、検出すべき物質(抗原)に種々の標識を付した特異的結合物質(抗体)をクロマト材上で反応させて検出すべき物質と標識特異的結合物質との複合体(抗原-抗体複合体)を形成させ、これを種々の手段により確認(検出)することが行なわれる。標識としては、放射性同位元素、発色団、蛍光団、酵素等があげられる。検出手段としては、放射線検出器、分光光度計等、または目視が挙げられる。

【0004】特開昭64-32169号公報には、クロマトグラフ的に可動で、視覚的に検出可能なシグナルを生じ得るコロイド粒子標識特異的結合物質(抗体)を利用したイムノクロマト法による定性分析法および装置が記載されている。本公報には、目視による検出を可能とするための手段の一種が開示されている。

【0005】本公報に記載の方法は、試料中の物質(抗原)の存在の有無または量を測定する方法であって、

(a) 分析すべき物質(抗原)を含む試料をクロマトグラフ媒体に接触させ、(b) 該クロマトグラフ媒体上で該コロイド粒子標識物質(標識抗体)を移動させることによって該コロイド粒子標識物質(標識抗体)の少なくとも一部を反応部位に移動させて結合反応させ、ついで(c) 試料中の物質(抗原)の存在の有無および量を表示するため反応部位で該コロイド物質により生じた検出可能な応答を決定することからなる。

【0006】特表平1-503174号公報には、クロマトグラフ媒体上に湿潤状態において自由に移動し得る、検出すべき物質(抗原)に特異的に結合する標識された第1抗体(以下、標識第1抗体という)およびクロマトグラフ媒体上に固定された、検出すべき物質(抗原)に特異的に結合する標識されていない第2抗体(第2抗体は第1抗体とは異なる抗原結合部位を有する)

(以下、無標識第2抗体という)が配置されており、検出すべき物質を含む液体試料をクロマトグラフ媒体の一端に添加し、クロマトグラフ媒体中を移動して標識第1抗体と反応した後に無標識第2抗体と反応し、クロマトグラフ媒体上の検出区域において検出すべき物質の存在

の有無を確認できる装置が開示されている。本公報記載の装置に用いられている原理は、いわゆる(免疫学的)サンディッチ法と呼ばれるものである。従来、試料中の検出すべき物質の量を定量するには、検出すべき物質を含む試料を適宜希釈して一定感度を有する測定試薬による定性反応を行ない、陽性を示す最高希釈倍率に感度を乗じて半定量値を求める方法、または検体を希釈することなく測定感度の異なる試薬にて定性反応を行ない、陽性を示す試薬の感度をもって半定量値としていた。定量分析の手法としては、試験管やマイクロタイターウエルのような容器中で行なう液相アッセイ、クロマトグラフ媒体上で行なう固相アッセイなどがある。上記2件の公報に記載の方法においても、定量は試料を希釈することによって行なっている。

【0007】最近出願公開された特開平4-351962号公報には、試料を希釈せずに半定量を行なうことのできる特異結合分析方法および装置が開示されている。本公報記載の方法は、クロマトグラフィーの手法を用い、試料中の分析対象物を定性または定量するに際し、測定系に特定物質を存在させ、該特定物質の存在により、分析対象物の指標として測定される標識物質量を小さくすることにより、結果として分析対象物を含む試料を希釈したのと同様の結果(以下、希釈効果という)とするものである。

【0008】本公報記載の典型的な方法では、試料添加部に添加された分析対象物(a)は、所定量(濃度)でクロマト材上に固定化されることなく存在する特定物質(b)および所定量でクロマト材上に固定化されることなく存在するの標識特異結合物質(e)と(特異結合物質存在部において)接触する。一定量の分析対象物(a)は特定物質(b)と結合するが、分析対象物(a)が特定物質(b)より過剰に存在する場合には特定物質(b)と結合し得る部位が存在したままさらに特異結合物質(特定物質(b)または分析対象物(a)に対し特定物質(b)と同じ結合部位と結合し得る物質(g))がクロマト材上に固定化されて存在する部位(検出部)へ移動する。検出部においては、特定物質(b)と結合し得る部位が存在しない、少なくとも特定物質(b)と結合した分析対象物(a)は、検出部を通過する。少なくとも特定物質(b)と結合し得る部位を有する分析対象物(a)-標識特異結合物質(e)結合体(f)のみが検出部において固定化され、この固定化された結合体(f)を種々の検出手段により検出するものである。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】従来、試料中の分析対象物を半定量するためには、一般に試料の希釈を必要としていた。また、試料の希釈を必要としない測定感度の異なる試薬による方法は、各測定感度における反応の強さが異なるため判定が難しい等の欠点があり、あまり一般に実用化されていない。

【0010】試料の希釈操作は、医療、特に臨床検査等の現場において、試験実施者は被検試料たる血液、尿等からの試験実施者に対する病原菌の感染の可能性を増加させている。また、大量の試料を半定量測定する場合に、希釈操作が必要なれば操作効率を格段に向上させられる。そこで、本発明は、試料の希釈を必要としない免疫化学的簡易半定量方法および装置を提供することを目的とする。

【0011】本発明と同様に試料の希釈を必要としない半定量方法として、上述した特開平4-351962号公報記載の発明があるが、本公報の方法では、検体の「希釈効果」の調整に関与する要因が多く、希釈効果の調整が困難であり、半定量値幅を狭く設定することができず、測定精度の点で難点があった。本発明は、試料の「希釈効果」の調整に関与する要因が少ないため、希釈効果の調整が容易であり、感度良く、即ち半定量値幅を狭く設定することができる免疫化学的半定量方法および装置を提供することをも目的とする。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記目的を達成するため、鋭意研究を行ない、クロマト法による免疫化学的簡易アッセイにおいて、分析対象物の定性分析の前に、所定量で固定化されて存在する分析対象物に対する抗体により、固定化された抗体量に対応する試料中の分析対象物の一定量を捕捉し、その後の免疫化学的定性分析に付される分析対象物濃度を減少させることを特徴とする免疫化学的簡易半定量方法、および分析対象物を含む試料を添加するための試料添加部(A)、試料中の分析対象物の一定量を捕捉する抗体が所定量で固定化されて存在する抗体固定部(B)、分析対象物の存在の有無を検出するための指標となる標識物質がクロマト移動しうる状態で存在する標識物質存在部(C)、標識物質を検出するための検出用物質が固定化されて存在する検出部(D)および添加された試料とともに分析対象物の有無の検出に関与しない標識物質を吸収除去する吸収部(E)からなるイムノクロマト法による免疫化学的簡易半定量装置により、上記目的を達成し得ることを見出した本発明を完成した。

【0013】本発明の半定量方法および装置においては、一連のクロマト分析において、定性分析の前に分析対象物捕捉用の固定化された抗体で試料中の分析対象物の一定量を捕捉し、定性分析に付される試料中の分析対象物量(濃度)を予め減少させることにより、分析対象物を含む試料を希釈してからイムノクロマト法による定性分析に付したのと同様の効果(希釈効果)が得られるものである。

【0014】即ち、捕捉用抗体の固定量を段階的に変化させた(それぞれのユニットにおける試料の希釈の度合いが異なる)数個のユニットに同一の試料を添加してアッセイを行なえば、引続く各ユニットでの共通の感度を

有する定性分析において、その分析結果が陽性から陰性または陰性から陽性に変化するユニットに設定された捕捉用抗体の固定量からその試料中の分析対象物の半定量値を決定することができる。

【0015】以下、本発明を詳細に説明する。本発明において分析対象物となり得るものとしては、大きく分けて完全抗原とハプテン（不完全抗原）とがある。ここに完全抗原とは、それ自体で抗体産生を誘起する能力（免疫原性）を有する抗原物質をいい、主として分子量の大きいペプチドホルモン類等がこれに含まれる。ハプテン（不完全抗原）とは、抗体と結合できるが、それ自身では抗体産生を誘起する能力を有しないものをいい、比較的分子量の小さい（分子量1000以下程度）ペプチド類等がこれに含まれる。なお、ハプテンは、適当な担体、例えばウシ血清アルブミン等の蛋白に結合させると、抗体産生能を獲得する。◎以下にこれらの具体例を示すが、ここに記載されたものに限定されるわけではない。

【0016】完全抗原の例：

(1) ペプチドホルモンの例

- 1) 成長ホルモン (G H)、副腎皮質刺激ホルモン (A C T H)、メラミン細胞刺激ホルモン (M S H)、プロラクチン、甲状腺刺激ホルモン (T S H)、黄体形成ホルモン (L H)、卵胞刺激ホルモン (F S H)、オキシトシン等の下垂体ホルモン
- 2) カルシトニン、副甲状腺ホルモン等のカルシウム代謝調節ホルモン
- 3) インシュリン、プロインシュリン、胰ホルモン
- 4) ガストリシン、セクレチシン等の消化管ホルモン
- 5) アンギオテンシン、ブラジキニン等の血管に作用するホルモン
- 6) ヒト胎盤性性腺刺激ホルモン (h C G)、ヒト胎盤催乳ホルモン (h P L) 等の胎盤ホルモン

(2) その他の物質の例

- 1) 前立腺性酸性フォスファターゼ (P A P)、アルカリ性フォスファターゼ、トランスアミナーゼ、乳酸脱水素酵素 (L D H)、トランスアミナーゼ、トリプシン、ペプシノーゲン等の酵素
- 2) α -フェトプロテイン (A F P)、ガン胎児性抗原 (C E A) 等のガン特異物質
- 3) 免疫グロブリンG (I g G)、フィブリンーフィブリノーゲン分解産物 (F D P)、抗トロンビンIII (A T III)、トランスフェリン等の血清蛋白成分
- 4) リュウマチ因子、セロトニン、ウロキナーゼ、フェリチン、サブスタンスP等の物質

その他生体成分およびそれらの代謝産物等の多くの物質が挙げられる。

【0017】ハプテン（不完全抗原）の例：

(1) ステロイド系ハプテン

- 1) エストロン、エストラジオール、エストリオール、

エステトロール、エクイリン、エクイレニン等の卵胞ホルモン

2) ブロゲステロン、ブレグナンジオール、ブレグナントリオール、19-ノルーエチステロンおよび酢酸クロルマジノン等の天然または合成黄体ホルモン

3) テストステロン、デヒドロエピアンドロステロン、ジヒドロテストステロン、アンドロステン、エチオコラノロン等の男性ホルモン

4) コルチゾール、コルチゾン、デオキシコルチコステロン、アルドステロン、テトラヒドロコルチゾール等の副腎皮質ホルモン

5) ビタミンD類、コレステロール、コール酸、デオキシコール酸、ケノコール酸等の胆汁酸、強心性ステロイド、サポニン、サボゲニン等のその他のステロイド類

(2) 生理活性アミン類

1) エビネフリン、ノルエビネフリン、ドーバミン、エフェドリン等のカテコールアミンおよびそれらの代謝産物

2) モルヒネ、コデイン、ヘロイン、塩酸モルヒネ、コカイン、メスカリン、ババペリン、ナルコチン、ヨヒンビン、レセルビン、エルゴタミン、ストリキニーネ等の生理活性アルカロイド類

3) L S D、アンフェタミン、メタンフェタミン、メブロバメート等のアミノ基含有向精神薬類

(3) その他の例

1) T R H、L H-R H等の抗原性を有しない低分子ペプチド類

2) ジヨードサイロニン、トリヨードサイロニン、サイロキシン等の甲状腺ホルモン類

3) プロスタグラジンE₁、プロスタグラジンE₂、プロスタグラジンF₁、 α 等のプロスタグラジン類

4) ビタミンA、ビタミンB類 (ビタミンB₁、B₂、B₆、B₁₂等)、ビタミンE、ビタミンK等のビタミン類

5) ベニシリン、アクチノマイシン、クロロマイセチン、テトラサイクリン等の抗生物質類

6) その他生体内に存在する成分、生体内に投与された薬物およびその代謝産物等。

【0018】本発明で試料（検体）となり得るものとしては、上記分析対象物を含有するものであれば何でもよいが、尿、血清、血漿、血液、唾液、羊水等の生体試料が主に挙げられる。

【0019】分析対象物の有無の指標となる標識は、直接標識または間接標識のいずれであってもよい。直接標識は、検定結果を目視によって観察でき、追加の処理または工程を必要としない点で好ましい。間接標識の場合には、アッセイ終了後に標識を視覚化するための処理、工程または装置が必要である。

【0020】直接標識に用いることができる標識物としては、金属ゾル、着色ラテックス粒子、色指示薬、リボ

ゾームに含有されている着色物質、各種染料、各種顔料等の色素類、炭素ゾルのような非金属ゾル、ルミノール誘導体、アクリジニウムエスチル等の化学発光物質、フルオレセイン、ローダミン等の蛍光物質等が挙げられるがこれらに限定されるものではない。

【0021】間接標識に用いることができる標識物としては、ペルオキシダーゼ、β-ガラクトシダーゼ、アルカリフェオヌクターゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼ等の各種酵素等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0022】直接標識による場合には、肉眼での色調観察、色濃度、発光強度、蛍光強度等の測定により、間接標識の場合には、使用した酵素によりその酵素の基質あるいはクロモーゲンの変化によって得られる色濃度、発光強度等を測定することにより検出を行なう。

【0023】以下に本発明の半定量方法及び半定量装置を順次説明する。本発明の半定量方法は、試料中の分析対象物を定量するに際し、試料中の分析対象物の一定量を、所定量で固定化されて存在する捕捉用抗体により、捕捉用抗体の固定量（濃度）に応じて捕捉し、引続いて行なわれる免疫化学的定性分析に付される（関与する）分析対象物濃度を減少させることにより、結果的に分析対象物濃度を予め希釈して用いたのと同じ効果（希釈効果）が得られ、試料を希釈することなく精度よく半定量をおこなうことができることを特徴とするものである。

【0024】ここで、本発明の半定量方法を分析対象物が完全抗原である場合とハプテンである場合とに分けてさらに詳細に説明する。

【0025】I. 分析対象物が完全抗原の場合

図1～3に基づいて説明する。図1～3は、アッセイを経時的に表したものである。

【0026】試料中の分析対象物が完全抗原の場合には、免疫学的サンドイッチ反応を原理とし、構成する反応系において、検出用物質が抗体（以下、検出用抗体IIまたは単に抗体IIIという）であり、標識物質も標識された抗体（以下、標識抗体IIまたは単に抗体IIという）である。これらの抗体II及び抗体IIIは、互に同一抗原（分析対象物）上の異なる抗原決定基を認識する抗体でなければならない。

【0027】分析対象物を捕捉する捕捉用抗体（以下、捕捉用抗体Iまたは単に抗体Iという）は、抗体IIまたは抗体IIIと同じ抗原決定基を認識するか、または抗体I Iおよび抗体IIIとは異なる抗原決定基を認識する抗体であればよい。

【0028】ある濃度の分析対象物を含む試料を試料添加部（A）に添加し（図1）、クロマト移動により抗体固定部（B）まで移動させ、ここに固定化されて存在する捕捉用抗体Iと反応させて、抗体Iの固定化抗体量に応じて分析対象物の一定量を捕捉した後、捕捉されなかつた分析対象物は、標識物質存在部（C）にクロマト移

動しうる状態で存在する標識抗体IIと反応して分析対象物-標識抗体II複合体を形成して（図2）、検出用抗体IIIが固定化されて存在する検出部（D）までクロマト移動し、抗体IIIと反応して抗体III-分析対象物-標識抗体IIのサンドイッチ複合体を形成して検出部に不溶化されて留まる。分析対象物と結合していない標識抗体IIおよび過剰の分析対象物等は、検出部（D）を通過し吸収部（E）まで移動して反応系外へ除去される（図3）。

【0029】検出部（D）に不溶化されて留まつた抗体III-分析対象物-標識抗体IIのサンドイッチ複合体の標識を指標として分析対象物の有無を確認する。

【0030】この方法では、検出部（D）の検出用抗体IIIの量と標識抗体IIの量により、分析対象物の最少検出濃度（検出感度）が決定される。試料中の分析対象物濃度が検出感度より高い場合、抗体固定部（B）の抗体Iの固定量に応じて一定量の分析対象物が捕捉されることにより、試料が希釈され、これによって分析対象物濃度を検出感度まで減少させるのと同様の効果（希釈効果）が得られ、抗体固定部（B）の抗体Iの量を調整することによって適切な濃度幅で半定量を行なうことができる。

【0031】ここで、抗体IおよびIIIは、ポリクロナール抗体であってもよいし、モノクロナール抗体であってもよいが、測定感度等の点から特異性の高いモノクロナール抗体の方が好ましく、抗体IIは、抗原と反応して凝集が生じるとクロマト移動に支障を生じるため、抗体Iおよび抗体IIIと同一抗原上の異なる抗原決定基を認識するモノクロナール抗体でなければならない。ポリクロナール抗体およびモノクロナール抗体は、公知の方法により作製することができる。ポリクロナール抗体であれば、常法に従い、抗原（分析対象物）を動物に免疫して得た抗血清中から目的とする抗体を分離する。モノクロナール抗体であれば、例えば、ケーラーとミルスタイルの一般的方法（Nature 256 (1975) 495-497）に従い、抗原（分析対象物）で免疫したマウスの脾臓細胞と骨髄腫細胞を融合させ、目的の抗体を産生する融合細胞を選択し、この融合細胞から産生されるモノクロナール抗体を得る。

【0032】II. 分析対象物がハプテンの場合

測定原理により、それぞれ図4～6および図7～9に基づいて説明する。分析対象物がハプテンの場合は、検出部（D）に固定化されて存在する検出用物質に対する競合反応を原理とする。

【0033】(1) 図4～6の場合は、検出部（D）に検出用物質としてハプテン抗体（以下、検出用抗体Vまたは単に抗体Vという）を固定化し、標識物質存在部

(C)に標識物質として標識されたハプテン-キャリア蛋白結合物またはハプテン若しくはその化学的変性物を

50 化学的に結合せしめたカルボキシル基含有水溶性モノオ

レフィン系高分子化合物（以下、標識-ハブテン-キャリア結合物という）をクロマト移動しうる状態で保持させ、抗体固定部（B）にはハブテン抗体（以下、捕捉用抗体IVまたは単に抗体IVという）を分析対象物捕捉用抗体として固定する。

【0034】ハブテン抗体IVおよびVは分析対象物ハブテンに対する結合能を有すれば同一の抗体である必要はなく、分析対象物ハブテンに対する交叉反応により分析対象物と結合するものであってもよい。

【0035】標識物質の構成成分であるハブテンは、分析対象物であるハブテンそのものであってもよいし、抗体Vに対し分析対象物ハブテンとの交叉反応により結合できるハブテンであってもよい。

【0036】ある濃度の分析対象物を含む試料を試料添加部（A）に添加し（図4）、クロマト移動により抗体固定部（B）に移動させ、捕捉用抗体IVと反応させ、捕捉用抗体IVの固定量に応じて分析対象物の一定量を捕捉した後（図5）、捕捉されなかった分析対象物および標識物質存在部（C）にクロマト移動しうる状態で存在する標識-ハブテン-キャリア結合物は、クロマト移動により検出部（D）へ移動し、検出部（D）に固定化されて存在する検出用抗体Vと競合的に結合する。検出部（D）に結合されないものは、吸収部（E）までクロマト移動して反応系外へ除去される（図6）。

【0037】この方法では、検出部（D）の検出用抗体Vの量と標識物質（標識-ハブテン-キャリア結合物）量により、両者間の結合反応を競合阻止し得る最少の分析対象物ハブテンの濃度（検出感度）が決定される。

【0038】試料中の分析対象物ハブテン濃度が検出感度より高い場合、抗体固定部（B）の捕捉用抗体IVの固定量に応じて一定量の分析対象物ハブテンを捕捉することにより、試料中の分析対象物ハブテン濃度を検出感度まで減少させ、試料を希釈して用いたのと同じ効果（希釈効果）が得られ、捕捉用抗体IVの固定量を調整することにより適切な濃度幅で半定量を行なうことができる。

【0039】(2) 図7～9の場合は、検出部（D）に検出用物質としてハブテン-キャリア蛋白結合物またはハブテン若しくはその化学的変性物を化学的に結合せしめたカルボキシル基含有水溶性モノオレフィン系高分子化合物（以下、検出用ハブテン-キャリア結合物という）を固定化し、標識物質存在部（C）に標識物質として標識ハブテン抗体（以下、標識抗体VIIまたは単に抗体VIIという）をクロマト移動しうる状態で保持させ、抗体固定部（B）には、分析対象物ハブテンの捕捉用抗体（以下、捕捉用抗体VIまたは単に抗体VIという）が固定されている。

【0040】抗体固定部（B）の捕捉用抗体VIと標識物質存在部（C）の標識抗体VIIは分析対象物のハブテンに対する結合能を有するものであれば同一の抗体である必要はなく、交叉反応により分析対象物ハブテンと結合

する抗体であってもよい。

【0041】また、検出部（D）に不溶化されている検出用ハブテン-キャリア結合物の構成成分であるハブテンは、分析対象物であるハブテンそのものであってもよいし、分析対象物ハブテンとの交叉反応により標識抗体VIIと結合できるハブテンであってもよい。

【0042】ある濃度の分析対象物ハブテンを含有する試料を試料添加部（A）に添加し（図7）、クロマト移動により抗体固定部（B）へ移動させ、捕捉用抗体VIと反応させ、捕捉用抗体の固定量に応じた量の分析対象物ハブテンを捕捉する。ここで捕捉されなかった分析対象物ハブテンは、標識物質存在部（C）へ移動し、クロマト移動しうる状態で保持されている標識抗体VIIと反応して分析対象物ハブテン-標識抗体VII複合体を形成する（図8）。この複合体および未反応の標識抗体VIIは検出部（D）へ移動し、ここに固定化されている検出用ハブテン-キャリア結合物と未反応の標識抗体VIIが結合する。検出部（D）に結合されないものは、吸収部（E）までクロマト移動して反応系外へ除去される（図9）。

【0043】この方法では、検出部（D）に存在する検出用ハブテン-キャリア結合物のハブテン量と標識物質存在部（C）の標識抗体VII量により、両者による結合反応を競合阻止し得る最少の分析対象物ハブテン濃度（検出感度）が決定される。

【0044】試料中の分析対象物ハブテン濃度が検出感度より高い場合は、抗体固定部（B）の捕捉用抗体VI量に応じて一定量の分析対象物ハブテンを捕捉することにより、試料中の分析対象物濃度を減少させ、試料を検出感度まで希釈したのと同様の効果（希釈効果）が得られ、抗体固定部（B）の捕捉用抗体VI量の調整により、適切な幅で半定量することができる。

【0045】ここで、本発明で用いるハブテン抗体類は、コンベンショナルな抗体であっても、モノクロナール抗体であってもよく、公知の方法により作製することができる。ハブテン（分析対象物）またはその化学的変性物を、ウシ血清アルブミン（BSA）等の抗原性を有する物質と結合させ、これを抗原として常法に従い、動物を免疫することにより抗血清を得、得られた抗血清中から、ハブテン（分析対象物）に対してのみ反応性を有する抗体を分離する。

【0046】モノクロナール抗体であれば、前記抗原で免疫したマウスの脾細胞と骨髓腫細胞を融合させ、目的の抗体を産生する融合細胞を選別し、この融合細胞から產生されるモノクロナール抗体を得る。

【0047】また、ハブテン-キャリア蛋白結合物または、ハブテン若しくはその化学的変性物を化学的に結合せしめたカルボキシル基含有水溶性モノオレフィン系高分子化合物の構成成分であるハブテンまたはその化学的変性物は、競合反応に関与するものであり、キャリア蛋

白またはカルボキシル基含有水溶性モノオレフィン系高分子化合物は、標識物、クロマト材との結合部位を提供し、対応するハブテン抗体との反応性を高める等の役割を果すものである。

【0048】キャリア蛋白としては、ウシ血清アルブミン (BSA)、ウサギ血清アルブミン (RSA)、ヤギ血清アルブミン (GSA)、ヒト血清アルブミン (HSA) など血清由来の蛋白や卵白アルブミン (EA) 等を用いることができる。なお、これらを使用する場合には、ハブテン抗体を作製する際にハブテンに抗原性を持たせる目的でこれらの蛋白 (例えば BSA) を使用しているので、これらの蛋白に対して結合性を有する抗体を完全に吸収除去しておく必要がある。

【0049】ハブテンの化学的変性は、カルボキシル基含有水溶性モノオレフィン系高分子化合物 (以下、スペーサーという) の官能基、例えば、カルボキシル基や水酸基と化学的に結合し得るようにハブテンに化学的修飾を加えるものである。化学的変性は、用いるハブテンの化学構造に応じて公知の方法により行なうことができる。特に、ハブテンにカルボキシル基、アミノ基、水酸基を導入する化学的変性方法が好ましい。

【0050】本発明で使用するスペーサーは、生理的に不活性であり、一般に抗原性を有しない物質である。スペーサーは、カルボキシル基の他に水酸基を有していてもよく、これらの官能基は、ハブテンまたはその化学的変性物との化学的結合に関与するだけでなく、高分子化合物であるスペーサーに水溶性を付与する役割を有する。ここで、スペーサー (カルボキシル基含有水溶性モノオレフィン系高分子化合物) の「水溶性」とは、スペーサーの少なくとも 1 重量部が 1000 重量部の蒸留水に完全に溶解し、透明な溶液を形成することを意味する。

【0051】スペーサーの平均分子量は、約 10³～10⁷ またはそれ以上であってもよく、通常数万～数百万程度のものが好適である。

【0052】スペーサーの具体例としては、例えば、アクリル酸またはメタアクリル酸のホモ-またはコ-ボリマー；マレイン酸と酢酸ビニルとの共重合体またはそのケン化物、マレイン酸と例えればビニルアルコール、低級アルキルビニルエーテル、アクリル酸またはその低級アルキルエステル、メタアクリル酸またはその低級アルキルエステルとの共重合体またはこれらの加水分解物が挙げられる。さらにスペーサーは、例えば、アクリル酸またはメタアクリル酸と、例えればアクリル酸の β-ヒドロキシエチルエステルまたはアクリルアミドとの共重合物、あるいは前記モノマーを構成単位とする三元共重合体であってもよい。

【0053】ハブテンまたはその化学的変性物とスペーサーとの化学的結合は、アミド結合またはエステル結合によって行なうが、特にアミド結合によるのが好まし

い。アミド結合を形成させる場合は、例えば、公知のカルボジイミド法、カルボニルジイミダゾール法、混合酸無水物法、活性エステル法、アシド法、酸クロリド法およびジフェニルホスホリルアシド (DPPA) 法等が挙げられ、特にカルボジイミド法または DPPA 法が好ましい。上記いずれの方法を用いてもよいが、ハブテンの有するスペーサーとの化学的結合に関与しない官能基の存在によっては不安定なものもあるので、あまり過激な条件を必要とする方法は避けるべきである。エステル結合の形成には、ハブテンまたはその化学的変性物の反応性水酸基とスペーサーのカルボキシル基を結合させる場合とその逆の場合がある。前者の場合には、スペーサーのカルボキシル基を反応性誘導体、例えれば酸クロリドとしてハブテンの水酸基と反応させるか、あるいはスペーサーが例えれば無水マレイン酸を含む共重合体であるならばそのままハブテンと反応させててもよい。後者の場合もエステル結合の形成方法の原理は前者と同様であるが、ハブテンによっては、そのカルボキシル基を反応性誘導体、例えれば酸クロリドに変換し得る程の安定性を有しないことがあり、この場合にはエステル結合を形成することは困難である。

【0054】次に、本発明の半定量装置を図 10、11 および 12 に基づいて説明する。図 10 および 11 は、本発明の半定量装置の基本例である。

【0055】本発明の半定量装置は、試料添加部 (A)、抗体固定部 (B)、標識物質存在部 (C)、検出部 (D) および吸収部 (E) を順次有するクロマト型の免疫化学的分析装置である。

【0056】図 10 および 11 で示した標識物質存在部 (C) は、検出部 (D) と同じクロマト材 (F) 上に位置していてもよいし、それぞれ独立した異なる材質のものであってもよい。また、抗体固定部 (B) は、標識物質存在部 (C) および/または検出部 (D) と異なる材質のものであってもよいし、標識物質存在部 (C) および/または検出部 (D) が設けられたのと同じクロマト材 (F) 上に設置してもよい。

【0057】図 10 (a) は、4 段階の濃度での半定量を行なえる半定量装置を示したものであり、図 11 (c) は、6 段階の濃度での半定量を行なえる半定量装置を示したものであるが、濃度の段階数は必要に応じて増減させることができる。例えば、図 10 (a) の半定量装置は、4 段階の濃度において共通の試料添加部 (A) と、抗体固定部 (B)、標識物質存在部 (C)、検出部 (D) の 3 つの部位からなる独立した 4 つのユニットおよび共通の吸収部 (E) から構成されており、各ユニットにおいて標識物質存在部 (C) および検出部 (D) における標識物質および検出用物質の量は同一であるが、抗体固定部 (B) における捕捉用抗体の固定量は、ユニット毎に異なる。

【0058】試料添加部 (A) を共通にすることは、そ

それぞれのユニットに分析対象物を含む試料を均一にクロマトさせるために必須である。そして、試料が各ユニットへより均一に移動するためには図12(e)および(f)に示す構成配置が好ましい。この場合には、吸収部(E)は各ユニット毎の構成となる。

【0059】本発明の半定量装置は、プラスチック板、ガラス板、フィルム等、好ましくは両面粘着テープを貼ったプラスチック板やガラス板等の支持体(G)上に(A)、(B)、(C)、(D)の各部位を構成する材料を互に接し添加した試料が毛細管現象により部位(A)から(B)、(C)、(D)と均一に移動できるように配置するか、図11(d)のように、検出部(D)を含むクロマト材および抗体固定部(B)が支持体(G)に直接触れないように配置する。

【0060】次に、本発明の半定量装置の各部の構成について説明する。

試料添加部(A)

試料添加部の材質は、セルロース濾紙、ガラス繊維、ポリウレタン、ポリアセテート、酢酸セルロース、ナイロン、綿布等の均一な特性を有するものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0061】試料添加部は、添加された分析対象物を含む試料を受入れるだけでなく、試料中の不溶物粒子等を濾過する機能をも兼ねるので、セルロース濾紙、ガラス繊維濾紙等の濾過機能をも有する材質のものが好ましい。

【0062】試料中の分析対象物が試料添加部の材質に非特異的に吸着し、半定量の精度を低下させることを防止するため、試料添加部を構成する材質は、予め非特異的吸着防止処理して用いることが特に好ましい。非特異的吸着防止処理としては、例えば、不活性蛋白による処理、界面活性剤による処理等がある。不活性蛋白による処理は、例えば、材質を0.1~10%牛血清アルブミン(BSA)0.1Mトリス緩衝液(pH6~9)溶液、0.1~10%脱脂粉乳0.1Mトリス緩衝液(pH6~9)溶液、および/または0.1~10%カゼイン溶液などに浸し、37°C1時間または4°C一昼夜放置後、トリス緩衝液で洗浄後乾燥させることからなる。界面活性剤による処理は、例えば、材質を非イオン性界面活性剤であるツイーン20またはトリトンX100の0.01~1%溶液に浸し、そのまま乾燥することからなる。分析対象物、試料の種類によるが、不活性蛋白による処理と界面活性剤による処理を合わせて行なってから使用するのが好ましい。

【0063】抗体固定部(B)

抗体固定部の材質は、均質な特性を有し、捕捉用抗体の固定量を厳密に規定することができ、さらに大きさ、厚さ等の加工も容易なものが好ましい。

【0064】分析対象物の捕捉用抗体の固定量(濃度)が大きい半定量を目的とする場合には活性化された濾紙

を使用し、これに捕捉用抗体を化学的に結合するのが好適である。CNBr・活性化セルロースであればCesk a and Lundkvistの方法([Immunochemistry, 9, 1021 (1972)やLehtone and Viljanenらの方法]、[J. Immunol. Methods, 36, 63 (1980)および同, 34, 61 (1980)])、DBM・活性化セルロースであればAlwinの方法(Methods Enzymol., 68, 220 (1979))等の公知の方法により容易に活性化セルロース濾紙の調製を行なうことができる。また、市販の活性化ナイロン膜(ポールイムノダイン)を用いることもできる。

【0065】上記の様な活性化ペーパーへの捕捉用抗体の化学結合も公知の方法に準じて行なうことができる(LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, Volume 15, Edited by R. H. BURDON and P. H. VAN KNIPPEMBERG ELSEVIER AMSTERDAM:NEW YORK, OXFORD (1985) P.318-322)。また、活性化ペーパーに第2物質(抗体、蛋白等)を介して捕捉用抗体を結合することもできる。介在する第2物質が抗体(以下、第2抗体という)の場合は、例えば固定化される捕捉用抗体がマウス由来のモノクロナール抗体の場合は、抗マウス γ G(ガンマグロブリン)異種動物抗体を活性化ペーパーに過剰に結合させた後、捕捉用抗体を適量免疫反応で結合させて用いることができる。介在する物質が蛋白である場合は、例えば、活性化ペーパーにプロテインAを過剰に結合させた後、捕捉用抗体を適量結合させて用いることができる。

【0066】また、分析対象物を捕捉する捕捉用抗体の固定量(濃度)が少ない半定量を目的とする場合には、クロマト材の標識物質存在部(C)より上流部に検出部(D)における検出用抗体(物質)の固定化と同様の方法にて捕捉用抗体を固定化することができる。

【0067】標識物質存在部(C)

標識物質存在部は、後述の検出部(D)に検出用物質を固定化し、分析対象物、標識物質の非特異的吸着防止処理をした後、標識物質をクロマト材の検出部(D)より上流部に塗付するか、またはセルロース濾紙、ガラス繊維濾紙、不織布などを非特異的吸着防止処理をした後、標識物質の一定量を含浸し、乾燥させて作製する。

【0068】本発明の半定量法において、標識物質の溶解速度、クロマト移動の均一性が測定感度の制御に影響を及ぼす場合があるので、前記非特異的吸着防止処理と共に標識物質のクロマト材への塗付または含浸は、0.1~10%マンニトールまたは0.1~30%サッカロース等の糖類の存在下で行なうことが好ましい。

【0069】検出部(D)

検出部は、クロマト材の一部に検出用物質を固定化させて作製する。検出用物質の固定化方法には、検出用物質をクロマト材の一部に物理的または化学的結合により直接固定化させる方法と、検出用物質をラテックス粒子な

どの微粒子に物理的または化学的に結合させ、この微粒子を多孔性のクロマト材の一部にトラップさせて固定化させる間接固定化方法がある。いずれの方法も用いることができるが、本発明の装置においては、不溶化の均一性、感度調整の容易さ等から直接固定化の方が好ましい。

【0070】検出部を構成する材質（クロマト材）は、多孔性ニトロセルロース膜、多孔性セルロース膜、ナイロン膜、ガラス繊維、不織布、布等、またはこれらに検出用物質結合用の活性基の有るものが好ましく、特に多孔性ニトロセルロース膜および活性化ナイロン膜が好ましい。

【0071】クロマト材への検出用物質の固定化の形状は、特に限定されるものではなく、いかなる形状であってもよいが、クロマト先端部に対し、標識物質の検出が均一となるクロマト材を横断した線形が特に好ましい。

【0072】なお、クロマト材は、検出用物質を固定化後、不活性蛋白による処理等により非特異的吸着防止処理をして用いるのが好ましい。

【0073】吸収部（E）

吸収部は、添加された試料がクロマト移動により物理的に吸収されると共に検出部（D）に不溶化されない未反応標識物質等を吸収除去する部位であり、セルロース濾紙、不織布、布、セルロースアセテート等吸水性材料が用いられる。

【0074】添加された試料のクロマト先端部が吸収部に届いてからのクロマトの速度は、吸収材の材質、大きさなどにより異なるので、その選定により分析対象物の測定に合った速度を設定することができる。

【0075】以上、本発明の半定量装置の各部位の構成について説明したが、装置の製造に際し各部の材質、大きさ、厚さ等のファクターによりクロマト速度（液の流れ速度）が異なる。従って、分析対象物の種類に応じて最も好適に半定量が行ない得るようにこれらのファクターは、自由に選択し設定できる。

【0076】本装置における測定感度は、主に検出部（D）に固定化されている検出用物質と標識物質存在部（C）の標識物質量によって決まる。また、本発明の半定量におけるいわゆる希釈効果は、原理的には、抗体固定部（B）の捕捉用抗体の固定量に依存しているが、半定量の精度は、試料添加部（A）から検出部（D）までの試料の流れ方向のクロマト材の長さおよび厚さ、即ち希釈効果を維持した試料の通過液量に依存している。特に試料添加部（A）から抗体固定部（B）に浸透した液量の内、抗体固定部（B）にて希釈効果を得た状態の試料液量が標識物質存在部（C）の標識物質を完全に溶解して検出部（D）に移動させるに足る液量であることが本発明の半定量を精度よく行なう上で最も重要である。

【0077】即ち、抗体固定部（B）において捕捉用抗

体の固定量に応じて分析対象物の一定量が捕捉されて希釈効果を得た状態の試料が、標識物質を検出部（D）まで完全にクロマト移動させることにより、クロマト完了後に捕捉用抗体が飽和となり、元の分析対象物濃度の試料が検出部（D）に流れてきても標識物質のクロマトはすでに終了しているため、検出部（D）における反応は影響を受けず、判定結果が変動することはない。

【0078】従って、抗体固定部（B）の大きさ、即ち抗体固定部（B）を希釈効果を得た状態で通過する試料の液量が、標識物質を検出部（D）まで完全にクロマト移動させるに充分な液量であることが希釈効果を確実にするために必須である。

【0079】なお、標識物質存在部（C）の構成の説明中に記載した様に、クロマトに際し、標識物質が容易に試料に溶解し、移動することも精度向上のために重要な点である。

【0080】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

20 【0081】実施例1 hCG（ヒト胎盤性性腺刺激ホルモン）の測定

1-a) 抗hCGモノクロナール抗体の製造

Balb/cマウスにhCG（10000iu/mg）をコンプリートフロイントアジュバントと共に3週間隔で3回背部皮下投与し、更に3週後hCGを腹腔内投与した。最終免疫3日後の脾細胞と骨髓腫細胞（NS-1）とを常法により細胞融合を行い、HAT選別後、クローニングを繰返してhCG特異抗体を分泌する融合細胞株ならびにhCG、hLH、hFSHと交差反応する α -サブユニットを認識するモノクロナール抗体を分泌する融合細胞株を得た。各細胞株を予めブリスタン投与したBalb/cマウスの腹腔内に投与し、腹水腫瘍を形成させて腹水を得た。得られた腹水を硫酸分画及びアフィジゲループロテインAマップスキットにより精製し、凍結乾燥して白色粉末のモノクロナール抗体を得た。得られた抗hCG特異的モノクロナール抗体は抗体固定部（B）及び検出部（D）の作製に用い、 α -サブユニットを認識するモノクロナール抗体は標識抗体作製に用いた。

40 【0082】1-b) 着色ラテックス標識抗hCG特異抗体の製造

1-a) 得られた抗hCG特異的モノクロナール抗体4mgを2mlのグリシン緩衝液（pH8.2）に溶解したのち、攪拌下に赤色ポリスチレンラテックス（固形分10%、日本合成ゴム社製、粒径0.303μm）

1.0mlを滴下混合し、室温で30分間及び56°Cで30分間攪拌を続けた。次いで冷却後、遠心分離した。

得られた沈殿をグリシン緩衝液10mlに懸濁して遠心分離する操作を2回繰り返した後、沈殿を1%BSA含有グリシン緩衝液10mlに懸濁させ、室温で1時間攪

拌

17

拌した後、遠心分離した。グリシン緩衝液による遠心洗浄操作を3回繰り返した後、沈殿を5%サッカロース、2.5%マンニトール、0.1%BSA含有グリシン緩衝液20mlに懸濁し、抗hCG特異的モノクロナール抗体感作着色ラテックスを製造した。

【0083】1-c) 試料添加部(A)の製造

クロマトグラフィー用濾紙(アドバンテック東洋社製、No.585、厚さ0.85mm)をカットして10×21mmの濾紙片を作製し、これを、5%脱脂粉乳(全国酪農連合会)含有0.1Mトリス緩衝液(pH8.2)溶液に浸漬して37°C1時間インキュベーション後、0.1Mトリス緩衝液(pH8.2)にて1回洗浄後、5%BSA(バイオセル社製)含有0.1Mトリス緩衝液(pH8.2)溶液に浸漬した。37°C1時間インキュベーション後、0.1Mトリス緩衝液(pH8.2)で1回洗浄、液切り後、0.05%ツイーン20含有0.1Mトリス緩衝液に浸した後、液切りして室温にて乾燥させた。

【0084】1-d) 抗体固定部(B)の製造

イ) CNBr活性化セルロース濾紙の作製

セルロース濾紙(アドバンテック東洋社製、No.50)を10×20mmの濾紙片に切断し、この2gを20mlの精製水に浸して膨潤させた後、60mlのCNBr溶液(2.0gのCNBrを60mlの精製水に溶解)を加え、直ちに攪拌下、1NNaOHによりpH10.5に調整し、引き続き1NNaOHにより30分間pHを10.5に維持した。反応終了後、濾紙片を50mlのNaHCO₃で12回洗浄後、50mlの精製水で2回洗浄後、50mlの20%アセトン、50%アセトン、70%アセトン、アセトンで各2回洗浄し、室温で乾燥させた。このCNBr活性化セルロース濾紙は抗体の固定まで4°Cに保存した。

【0085】ロ) 抗hCG特異的モノクロナール抗体固定セルロース濾紙の作製

1-a) で製造した抗hCG特異的モノクロナール抗体をカップリング緩衝液(0.1MNaHCO₃含有0.5MNaCl、pH8.3)にて0.0.1.0.2および0.4mg/mlの濃度の溶液を調製し、各5mlに上記イ) で作製したCNBr活性化セルロース濾紙10枚ずつを浸漬し、ゆっくり攪拌しながら室温で3時間反応させた。反応終了後、濾紙片をカップリング緩衝液にて2回洗浄後、各5mlの1Mエタノールアミン溶液に浸漬し、室温で2時間ゆっくり攪拌して未反応のCNBr活性基をブロックした後、0.1M酢酸緩衝液(pH4.0)-0.1Mトリス緩衝液(pH8)で3回洗浄後、室温で乾燥させ、使用時まで4°Cに保存した。

【0086】1-e) 検出部(D)の製造

ニトロセルロース膜(ザルトリウス社製、孔径8μm)を30×50mmの大きさに切断し、カマグ・リノマット(Cammg Linomat)IVを用いて中心部

18

(15mm)に1-a)で作製した抗hCG特異的モノクロナール抗体の1mg/ml溶液(50μg/mlBSA含有50mMトリス緩衝液(pH8.2))の10μlを線型にスプレイ後、25°C、湿度80%の恒温恒湿器中に25分間放置し、次いで0.1Mトリス緩衝液(pH8.2)に5%脱脂粉乳(全国酪農連合会)を溶解した溶液、5%BSA溶液に浸漬してブロッキングした後、1%サッカロース、1%マンニトール含有0.1Mトリス緩衝液にて洗浄し、室温に放置して乾燥させた。

【0087】1-f) 標識物質存在部(C)の製造

1-e) で製造した検出部(D)を含むニトロセルロース膜の線型に固定した検出部に平衡に一端から5mmの位置にカマグ・リノマットIVを用いて1-b) で作製した着色ラテックス標識抗hCG抗体20μlを線型にスプレイし、室温で乾燥させ、使用時まで4°Cに保存した。

【0088】1-g) 装置の製造

1-f) で製造した検出部(D)及び標識物質存在部(C)を含むニトロセルロースの幅50mmを4mmずつに切断して4×30mmの短冊とし、また、1-d) で各抗体溶液で作製した抗hCG特異的モノクロナール抗体固定セルロース濾紙についても4×7mmの短冊を作製した。図10(b)に示すように、ガラス板上に画面粘着テープを貼った支持体(G)上に、上記検出部(D)及び標識物質存在部(C)を含むニトロセルロース膜の短冊を図10(a)に示すように、1mm間隔で4枚、平行に並べて貼り、各々について抗hCG特異的モノクロナール抗体固定セルロース濾紙の短冊を右端に1mmの重なりをもって貼り、さらに右端に1mmの重なりを持って1-c) で製造した試料添加部(A)を貼った。一方、膜の左端には吸収部(E)としてクロマトグラフ用セルロース濾紙(アドバンテック東洋社製、No.585)の10×21mmの濾紙片を1mmの重なりを持って貼り、各々の連結を確実なものとした。同様にして本装置を5枚作製した。

【0089】1-h) 測定

hCGを0.10.20.30および40iu/l含有する尿を試料とし、これらの試料を1-g) で製造した装置各々の試料添加部(A)に200μlずつ添加した。試料中のhCGは抗体固定部(B)において捕捉用抗体量に応じて一定量捕捉された後、着色ラテックス標識抗体と結合してクロマト移動し、検出部(D)において線型に固定化されている抗hCG特異的モノクロナール抗体に結合し、未反応標識抗体および試料溶液はクロマト移動により吸収部(E)に移動後、検出部(D)における標識物由来の星色を観察した。

【0090】本装置における検出感度は、検出部(D)に固定化された抗hCGモノクロナール抗体量と、標識物質存在部(C)の着色ラテックス標識抗体量により1

0 iu/lと設定し、抗体固定部(B)の捕捉用抗体量、寸法等により半定量幅を設定した。

【0091】各試料を添加した装置の検出部(D)の呈色は表1(a)に示す通りであった。表1(b)には、赤色の*

*線型が認められた場合を「+」、認められなかった場合を「-」として表示した。

【0092】

【表1】

		(hCG濃度)				
		0	10	20	30	40 iu/l
(a)	0 ng/ml	—	—	—	—	—
	0.1	—	—	—	—	—
	0.2	—	—	—	—	—
	0.4	—	—	—	—	—
	1.0	—	+	+	+	+
(b)	0 ng/ml	—	—	—	—	—
	0.1	—	—	+	+	+
	0.2	—	—	—	+	+
	0.4	—	—	—	—	+
	1.0	—	—	—	—	—

【0093】表1に示す如く、本発明によれば試料中のhCGを10 iu/lの濃度幅で精度よく半定量できることが判った。なお、ここでは示さなかつたが、hCG未知濃度の試料を精度よく半定量するには、先ず、固定抗体量の幅を大きく設定して、例えば1000、200、40および0 iu/lの4段階で半定量を行い、次いで、例えば、試料中のhCGの濃度が0~40 iu/lの範囲であれば、上記実施例1の如くにして半定量することが好ましい。また、試料が他の範囲の濃度の場合には、各々の濃度域に応じて半定量できるユニットを作製して用いるのが好ましい。

【0094】実施例2 hLH(ヒト黄体形成ホルモン)の測定

2-a) 抗hLH特異的モノクロナール抗体の製造

hLHを抗原として、実施例1-a)と同様にBalb/cマウスに免疫し、その脾細胞を用いて細胞融合を行い、hLH特異的モノクロナール抗体を分泌する融合細胞株並びにhCG、hLH及びhFSHと交差反応する α -サブユニットを認識するモノクロナール抗体を分泌する融合細胞株を得た。各細胞株を予めブリスタン投与したBalb/cマウスの腹腔内に投与し、腹水腫瘍を形成させて腹水を得た。得られた腹水を硫安分画及びアフィジゲル-プロテインAマスクットにより精製し、凍結乾燥して白色粉末のモノクロナール抗体を得た。得られた抗hLH特異的モノクロナール抗体は、抗体固定部(B)及び検出部(D)の作製に用い、 α -サブユニットを認識するモノクロナール抗体は標識抗体の作製に用いた。

【0095】2-b) 金コロイド標識抗hLH特異的モノクロナール抗体の製造

2-a) で作製したhCG α -サブユニット認識モノク

ロナール抗体を10 mMヘペス(HEPES)緩衝液(pH 7.4)に溶解し200 μ g/mlを調製した。コロイド金溶液(金コロイド粒径10 nm、E-Yラボラトリーズ社製)4.0 mlにモノクロナール抗体溶液1.0 mlを添加し、室温で10分間攪拌後、0.05%PEG 20000、0.1%BSA含有10 mMヘペス緩衝液(pH 7.4)を0.25 ml加え、1時間攪拌した後、15000 rpm、10°C、30分間遠心分離した。得られた沈殿に、0.05%PEG 2000、0.0.1%BSA、0.3 M D-マンニトール含有1

0 mMヘペス緩衝液(pH 7.4)4.0 mlを添加して均一に懸濁させた後、更に10°C、15000 rpm、30分間遠心分離した。得られた沈殿に同緩衝液1.0 mlを加えて金コロイド標識抗hLH抗体を得た。得られた抗体は、使用時まで4°Cに保存した。

【0096】2-c) 試料添加部(A)の製造

クロマトグラフ用濾紙(アドバンテック東洋社製、No.526)をカットして10×25 mmの濾紙片を作製し、実施例1-c)と同様の方法により試料添加部(A)を製造した。

【0097】2-d) 抗体固定部(B)の製造

イ) CNBr活性化セルロース濾紙の作製
セルロース濾紙(アドバンテック東洋社製、No.514A)を10×20 mmに切断し、この2 gを実施例1-d)と同様にしてCNBr活性化セルロース濾紙を作製した。

【0098】ロ) 抗hLH特異抗体固定セルロース濾紙の作製

2-a) で作製した抗hLH特異的モノクロナール抗体の0.10、2.5、4.0、7.0および120 μ g/mlの溶液をカッピング緩衝液(0.1 M NaHCO₃含

50

21

有0.5MNaCl、pH8.3)にて調製し、各5m
1に上記イ)で作製したCNBr活性化セルロース濾紙
片5枚ずつを浸漬し、ゆっくり攪拌しながら室温で約3
時間、ついで4°Cで一夜反応させた。反応後、実施例1
-d)と同様に未反応活性基をブロックし、0.1M酢
酸緩衝液(pH4.0)-0.1Mトリス緩衝液(pH
8)で3回洗浄後、室温で乾燥させ、使用時まで4°Cに
て保存した。

[0099] 2-e) 検出部(D)の製造

ニトロセルロース膜(ザルトリウス社製、孔径8μm)
を30×50mmの大きさに切断し、カマグ・リノマットIVを用いて中心部(15mmの位置)に2-a)で
作製した抗hLH特異的モノクロナール抗体の200μ
g/m1溶液(50μg/m1 BSA含有50mMトリ
ス緩衝液、pH8.2)の10μlを線型にスプレイ
し、実施例1-e)と同様にブロッキング、乾燥を行
い、検出部(D)を含むニトロセルロース膜を作製し
た。

[0100] 2-f) 標識物質存在部(C)の製造

2-e)で製造した検出部(D)を含むニトロセルロース膜の検出部に平行に、一端から7mmの位置に、実施
例1-f)と同様にカマグ・リノマットIVを用いて、
2-b)で製造した金コロイド標識抗hLH特異的モノ
クロナール抗体を10%サッカロース溶液で2倍希釈
し、その50μlを線型にスプレイし、室温で乾燥さ
せ、使用時まで4°C(デシケータ中)で保存した。

[0101] 2-g) 装置の製造

2-f)で製造した検出部(D)および標識物質存在部
(C)を含むニトロセルロース膜の幅50mmを3mm
ずつに切断して3×30mmの短冊状とし、また、2-d)
で各抗体溶液で作製した抗hLH特異的モノクロナ
ール抗体固定セルロース濾紙も3mmずつに切断して3
×10mmの短冊を作成した。図11(d)に示すよう
に、イ)~ホ)の突起を付けたプラスチック板のイ)、
ロ)、ハ)およびホ)に両面粘着テープを貼り、ハ)に
における粘着テープにより検出部(D)および標識物質存

22

在部(C)を含むニトロセルロース膜の短冊を図11
(c)に示すように1mm間隔で6枚平行に並べて貼り、
各々について右端に抗hLH特異的モノクロナール抗体
固定セルロース濾紙の上記短冊を1mmの重なりを持って
貼り、さらにその右端に1mmの重なりを持って2-c)
で製造した試料添加部(A)を貼った。一方、膜の
左端には吸収部(E)としてクロマトグラフィー用濾紙
(アドバンテック東洋社製、No.585)の10×2
5mmの濾紙片をホ)の粘着テープで貼り、ニ)部で
は、メンプラン(クロマト材(F))の上に吸収部
(E)が2mm重なって接触するよう配置した。
[0102]以上のように、メンプラン(クロマト材
(F))および抗体固定部(B)が支持体に直接触れな
いような配置で本装置を7枚作製した。

[0103] 2-h) 測定

hLHを0、50、75、100、150、200および
300mIU/m1含有する尿を試料として2-g)
で製造した装置各々の試料添加部(A)に250μl添
加した。試料中のhLHは、抗体固定部(B)において
20捕捉用固定抗体量に応じて一定量が捕捉された後、金コ
ロイド標識抗体と結合してクロマト移動し、検出部
(D)において線型に固定化されている特異抗体に結合
し、未反応金コロイド標識抗体および試料溶液はクロマ
ト移動により吸収部(E)に移動後、検出部(D)における
標識物由来の星色を観察した。

[0104]なお、本装置における検出感度は、検出部
(D)に固定化された抗hLH特異的モノクロナール抗
体量と、標識物質存在部(C)の金コロイド標識抗体量
により50mIU/m1と設定し、抗体固定部(B)の
30捕捉用抗体量、寸法等により半定量幅を設定した。

[0105]各試料を添加した装置の検出部(D)の星
色は、表2(a)に示す通りであった。表2(b)は、赤色の
線型が認められた場合を「+」、認められなかった場合
を「-」と示した。

[0106]

【表2】

		(h LH濃度)						
		0	50	75	100	150	200	300 miu/ml
(a)	0 $\mu\text{g}/\text{ml}$		1	1	1	1	1	1
	10			1	1	1	1	1
	25				1	1	1	1
	40					1	1	1
	70						1	1
	120							1
	0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	-	+	+	+	+	+	+
(b)	10	-	-	+	+	+	+	+
	25	-	-	-	+	+	+	+
	40	-	-	-	-	+	+	+
	75	-	-	-	-	-	+	+
	120	-	-	-	-	-	-	+

【0107】実施例3 エストロゲンの測定

3-a) エストリオール-16-グルクロナイト-BSA

Aの製造

エストリオール-16-グルクロナイト40mgをジメチルホルムアミド1.0mlに溶解し、これに4°C以下でトリ-n-ブチルアミン20.6 μl を添加したのち、イソブチルクロロカーボネート11.2 μl を加え30分間攪拌した。これに予めBSA(ウシ血清アルブミン)117mgを2.8mlの水に溶解したものを1NNaOH溶液150 μl を加えた後、ジメチルホルムアミド2.0mlを加え、8°Cに保たれた液を混合した。次いでこれを8°Cで攪拌し、1時間後に1NNaOH溶液16.6 μl を加え、さらに3.5時間攪拌したのち、セファデックスG-25で未反応のエストリオール-16-グルクロナイトおよびトリ-n-ブチルアミン等の低分子試薬を除去した。さらにこれを透析(精製水に対し)した後、凍結乾燥すると、エストリオール-16-グルクロナイト-BSAが得られた。この抗原の凍乾末についてのコーベル反応により、BSA1モル当たりエストリオール-16-グルクロナイト27~30モルの結合が確認された。

【0108】3-b) 抗エストリオール-16-グルクロナイト抗体の製造

上記3-a)で製造したエストリオール-16-グルクロナイト-BSA2mgを1mlの生理食塩水に溶解し、同量のコンブリートフロインドアジュバントで乳化し、成熟家兔の足蹠および皮下に注射した。この注射を1ヶ月間隔で行い、抗体価の上昇を確認後全採血を行い抗血清を得た。この抗血清を56°C30分間非効化後BSAで吸収し、次いで硫酸アンモニウムによる塩析、DAAE-セルロースクロマトグラフィー、セファデックス

20 SG200によるゲル通過により精製したのち凍結乾燥し、白色粉末状の抗E, 16G抗体を得た。

【0109】3-c) エストリオール-16-グルクロナイト結合ポリアクリル酸(E, 16G-PAA)の作製

イ) エストリオール-16-グルクロナイト-ヘキサメチレンジアミン誘導体エストリオール-16-グルクロナイト93mgと、N-ハイドロキシコハク酸イミド25mgをDMF1.5mlに溶かし、氷冷下攪拌しつつDCC41mgを加える。30分後、モノベンジルオキシカルボニルヘキサメチレンジアミン塩酸塩55mg、トリエチルアミン0.03mlをDMF1mlに溶かした溶液を加え、氷冷下で2時間、室温で12時間攪拌を続ける。全体を減圧乾固し、残渣をプレバラティブ薄層クロマトグラフィーに付して目的の標記化合物82mg(対理論収率55%)を得た。本品はシリカゲル薄層クロマトグラフィーでRf=0.42(クロロホルム-メタノール5:1)を示した。

【0110】ロ) 上記イ)で得たエストリオール-16-グルクロナイト-ヘキサメチレンジアミン誘導体50

40 mgをメタノール3mlに溶かし、バラジウム黒1.0mgを加え、常温常圧で水素気流中で攪拌する。2時間で反応は終了し、触媒を濾去し、濾液を減圧濃縮し、残渣にエーテルを加え、カルボベンジルオキシ基が脱離した目的物35mgを粉末として得た。この生成物10mgをポリアクリル酸100mgとともにDMF2mlに溶かし、DCC4mgを加え、室温に50時間放置する。反応液を透析し、内液を通過後凍結乾燥すると、エストリオール-16-グルクロナイト結合ポリアクリル酸(E, 16G-PAA)95mgを白色粉末として得た。

50

25

[0111] 3-d) 着色ラテックス標識E, 16G-PAAの製造

赤色アミノ化ポリスチレンラテックス（固形分10%、日本合成ゴム社製、粒径0.37μm）0.5mlにN,N-ジメチルホルムアミド（DMF）・精製水（1:1）で調製した10%トリエチルアミン溶液1.2mlを加えて懸濁させ、15分攪拌後、遠心分離した。沈殿をDMF・水（1:1）1.0mlで2回、精製水1.0mlで1回遠心洗浄後、精製水0.5mlに懸濁させ、3-a）で製造したE, 16G-PAAの溶液（E, 16G-PAA 2mgを1mlの精製水に溶解）を加えて混合し、次いで1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩7.5mgを加え、攪拌下一夜反応を行った。反応終了後、遠心分離して得た沈殿をグリシン緩衝液1.0mlで3回遠心洗浄を繰返した後、30%サッカロース、0.1%GSA（ヤギ血清アルブミン）含有グリシン緩衝液1.0mlに懸濁し、E, 16G-PAA結合着色ラテックスを製造した。

[0112] 3-e) 試料添加部（A）の製造

ガラス纖維濾紙（アドバンテック東洋社製、GA-100、2.1φcm）を精製水に浸漬して洗浄、水切り後、これを2%脱脂粉乳2.5%BSA含有0.1Mトリス緩衝液（pH 8.2）溶液に浸漬し、4°Cにて一昼夜放置後0.1Mトリス緩衝液で洗浄し、液切りして室温で乾燥させた。

[0113] 3-f) 抗体固定部（B）の製造

イ) CNBr活性化セルロース濾紙の作製

セルロース濾紙（アドバンテック東洋社製、No. 526、厚さ0.70mm）を10×20mmの濾紙片に切断し、この2gを実施例1-d）と同様にしてCNBr活性化セルロース濾紙を作製した。

[0114] ロ) 抗E, 16G抗体固定セルロース濾紙の作製

3-b）で製造した抗E, 16G抗体の0.0.25、0.5および1.0mg/mlの溶液をカップリング緩衝液（0.1MNaHCO₃含有0.5MNaCl、pH 8.3）にて調製し、各5mlにイ）で作製したCNBr活性化セルロース濾紙片5枚ずつを浸漬し、室温で2時間ゆっくり攪拌して反応させた後、実施例1-d）と同様に未反応活性基をブロックし、0.1M酢酸緩衝液（pH 4.0）-0.1Mトリス緩衝液（pH 8）で3回洗浄後、室温で乾燥させ使用時まで4°Cで保存した。

[0115] 3-g) 検出部（D）の製造

ニトロセルロース膜（ザルトリウス社製、孔径5μm）を30×50mmの大きさに切断し、カマグ・リノマット1Vを用いて端から10mmの部分に抗E, 16Gモノクロナール抗体（帝国臓器製薬社製）の0.25mg/ml（BSA 50μl/ml含有50mMトリス緩衝液、pH 8.2）の10μlを線型にスプレイ後、実施

26

例1-c）と同様に処理して検出部（D）を含むニトロセルロース膜を作製した。

[0116] 3-h) 標識物質存在部（C）の製造

ポリエステル不織布（10×4mm、厚さ0.5mm）を0.1%可溶化カゼイン溶液に浸漬し、37°C 1時間放置後、液切りし、3-d）で製造した着色ラテックス標識E, 16G-PAA懸濁液を20μl含浸させ、室温にて乾燥し、使用時までデシケータ中に保存した。

[0117] 3-i) 装置の製造

3-g）で作製した検出部（D）を含むニトロセルロース膜の幅50mmを4mmずつに切断して4×30mmの短冊とし、3-f）で各抗体溶液で作製した抗E, 16G抗体固定セルロース濾紙も4mmずつに切断して4×10mmの短冊状とした。図12(f)に示すように、ガラス板（支持体（G））上に両面テープを貼り、その中央部に3-e）で製造した試料添加部（A）を貼り、次に上記各溶液で作製した抗E, 16G抗体固定セルロース濾紙の短冊を（A）のまわりに等間隔で1mmの重なりを持って貼り、（水平左側から抗体0.0.25、0.5および1.0mg/mlの順）、その先に3-h）で製造した標識物質存在部（C）を2mmの重なりをもって貼った。最後にクロマトグラフィー用セルロース濾紙（アドバンテック東洋社製、No. 585）の4×10mmの濾紙片を吸収部（E）として2mmの重なりをもって貼り、各々の連結を確実なものとした。同様にして本装置を5枚作製した。

[0118] 3-j) 測定

エストロゲンを0.1、2、4および8μg/ml含有する尿を試料として3-i）で製造した装置の各々の試料添加部（A）に300μlを添加した。試料中のエストロゲンは、抗体固定部（B）において、捕捉用固定抗体量に応じて一定量が捕捉された後、捕捉されなかったエストロゲンは標識物質存在部（C）の着色ラテックス標識E, 16G-PAAと共にクロマト移動により検出部（D）へ移動し、抗E, 16G抗体と競合的に結合し、未反応標識物質がクロマト移動により吸収部（E）に移動後、検出部（D）における標識物由来の呈色を観察した。

[0119] なお、本装置における検出感度は、検出部（D）に固定化された抗E, 16Gモノクロナール抗体量と、標識物質存在部（C）の着色ラテックス標識E, 16G-PAA量により両者の反応を1μg/mlのエストロゲンが阻止できるように設定し、抗体固定部（B）の捕捉用抗体量、寸法等により半定量幅を設定した。各試料を添加した装置の検出部（D）の呈色は、表3(a)に示す通りであった。表3(b)は、赤色の線型が認められた場合を「-」、認められなかつた場合を「+」と表示した。

[0120]

【表3】

		(エストロゲン濃度)				
		0	1	2	4	8 $\mu\text{g}/\text{ml}$
(捕捉用抗体量)		0 mg/ml	—	—	—	—
(a)	0.25	—	—	—	—	—
	0.5	—	—	—	—	—
	1.0	—	—	—	—	—
	2.0	—	+	+	+	+
(b)	0.25	—	—	+	+	+
	0.5	—	—	—	+	+
	1.0	—	—	—	—	+
	2.0	—	—	—	—	—

【0121】

【発明の効果】本発明により、試料の希釈を必要とせず、しかも、試料の「希釈効果」の調整に関与する要因が少ないため、希釈効果の調整が容易であり、感度良く、即ち半定量値幅を狭く設定することができる簡易な免疫化学的半定量方法および装置が提供された。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、分析対象物が完全抗原である場合の本発明の半定量方法の原理を示す図である（試料添加時）。

【図2】図2は、分析対象物が完全抗原である場合の本発明の半定量方法の原理を示す図である（アッセイ進行時）。

【図3】図3は、分析対象物が完全抗原である場合の本発明の半定量方法の原理を示す図である（アッセイ完了時）。

【図4】図4は、分析対象物がハブテンである場合の本発明の半定量方法の原理を示す図である（試料添加時）。

【図5】図5は、分析対象物がハブテンである場合の本

発明の半定量方法の原理を示す図である（アッセイ進行時）。

【図6】図6は、分析対象物がハブテンである場合の本発明の半定量方法の原理を示す図である（アッセイ完了時）。

【図7】図7は、分析対象物がハブテンである場合の本20発明の半定量方法の原理を示す図である（試料添加時）。

【図8】図8は、分析対象物がハブテンである場合の本発明の半定量方法の原理を示す図である（アッセイ進行時）。

【図9】図9は、分析対象物がハブテンである場合の本発明の半定量方法の原理を示す図である（アッセイ完了時）。

【図10】図10は、本発明の半定量装置の基本的構成を示す図である。

【図11】図11は、本発明の半定量装置の基本的構成を示す図である。

【図12】図12は、本発明の半定量装置の構成を示す図である。

[図1]

E (吸収部)		D (検出部)		C (標識物質存在部)(抗体固定部)		B (試料添加部)		A	
		G	G	◆	◆	+	+	+	+
		G	G	◆	◆	+	+	+	+
		G	G	◆	◆	+	+	+	+
		G	G	◆	◆	+	+	+	+
		G	G	◆	◆	+	+	+	+
		G	G	◆	◆	+	+	+	+
		G	G	◆	◆	+	+	+	+
		G	G	◆	◆	+	+	+	+
		G	G	◆	◆	+	+	+	+

+ : 完全抗原(分析対象物)

G : 捕足用抗体 I

◆ : 標識抗体 II

◆ : 標識物

G : 検出用抗体 III

【図2】

E <吸収部>		D <検出部>		C <標識物質存在部>(抗体固定部)<試料添加部>		B		A	
		◐	◐	+	+	◐	◐	◐	
		◐	◐	◐	◐	◐	◐	◐	
		◐	◐	◐	◐	◐	◐	◐	
		◐	◐	◐	◐	◐	◐	◐	
		◐	◐	◐	◐	◐	◐	◐	
		◐	◐	◐	◐	◐	◐	◐	
		◐	◐	◐	◐	◐	◐	◐	
		◐	◐	◐	◐	◐	◐	◐	
		◐	◐	◐	◐	◐	◐	◐	

+ : 完全抗原(分析対象物)

◐ : 捕足用抗体

◑ : 標識抗体

◆ : 標識物

◐ : 検出用抗体

【図3】

E (吸収部)		D (検出部)		C (標識物質存在部)<抗体固定部>(試料添加部)		B		A	
◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆
◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆
◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆
◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆
◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆

- ◆ : 完全抗原 (分析対象物)
- ◆ : 满足用抗体 [
- ◆ : 標識抗体]
- ◆ : 標識物
- ◆ : 検出用抗体]

[図4]

E <吸収部>		D <検出部>		C (標識物質存在部)<抗体固定部>		B <試料添加部>		A	
+	+	+	+	○○○○	○○○○	○○○○	○○○○	●●●●	●●●●
+	+	+	+	○○○○	○○○○	Y Y Y	Y Y Y	●●●●	●●●●
+	+	+	+	○○○○	○○○○	Y Y Y	Y Y Y	●●●●	●●●●
+	+	+	+	○○○○	○○○○	Y Y Y	Y Y Y	●●●●	●●●●
+	+	+	+	○○○○	○○○○	Y Y Y	Y Y Y	●●●●	●●●●
+	+	+	+	○○○○	○○○○	Y Y Y	Y Y Y	●●●●	●●●●
+	+	+	+	○○○○	○○○○	Y Y Y	Y Y Y	●●●●	●●●●
+	+	+	+	○○○○	○○○○	Y Y Y	Y Y Y	●●●●	●●●●
+	+	+	+	○○○○	○○○○	Y Y Y	Y Y Y	●●●●	●●●●

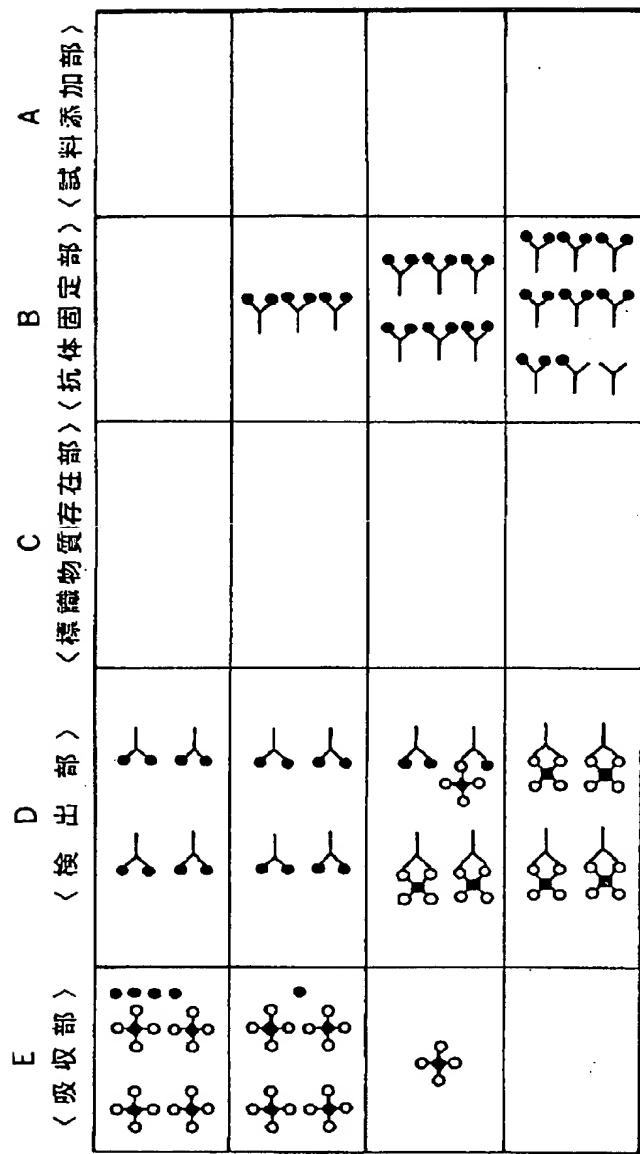
- : ハブテン (分析対象物)
- : ハブテン またはその化学的変性物
- Y : 捕足用抗体 V
- : 標識物
- : 標識物質
- Y : 検出用抗体 V
- Y : 標識物
- Y : キャリア蛋白 または
カルボキシル基含有
水溶性モノオレフィン系
高分子化合物

【図5】

E (吸収部)		D (検出部)		C (標識物質存在部)		B (抗体固定部)		A (試料添加部)	
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

● : ハブテン (分析対象物) ○ : ハブテン またはその化学的変性物
 × : 捕足用抗体 V ◆ : 標識物
 ○ : 標識物質
 × : 検出用抗体 V
 + : キャリア蛋白 または
 カルボキシル基含有
 水溶性モノオレフィン系
 高分子化合物

[図6]



● : ハブテン(分析対象物) ○ : ハブテン またはその化学的変性物

× : 捕足用抗体 IV ◆ : 標識物

× : 標識物質 △ : 検出用抗体 V

× : キャリア蛋白 または
カルボキシル基含有
水溶性モノレフィン系
高分子化合物

【図7】

E (吸収部)		D (検出部)		C (標識物質存在部)		B (抗体固定部)		A (試料添加部)	
○	○	○	○	×	×	Y	Y	Y	Y
○	○	○	○	×	×	Y	Y	Y	Y
○	○	○	○	×	×	Y	Y	Y	Y
○	○	○	○	×	×	Y	Y	Y	Y
○	○	○	○	×	×	Y	Y	Y	Y
○	○	○	○	×	×	Y	Y	Y	Y
○	○	○	○	×	×	Y	Y	Y	Y
○	○	○	○	×	×	Y	Y	Y	Y
○	○	○	○	×	×	Y	Y	Y	Y
○	○	○	○	×	×	Y	Y	Y	Y

○ : ハブテン (分析対象物) ○○ : 検出用物質

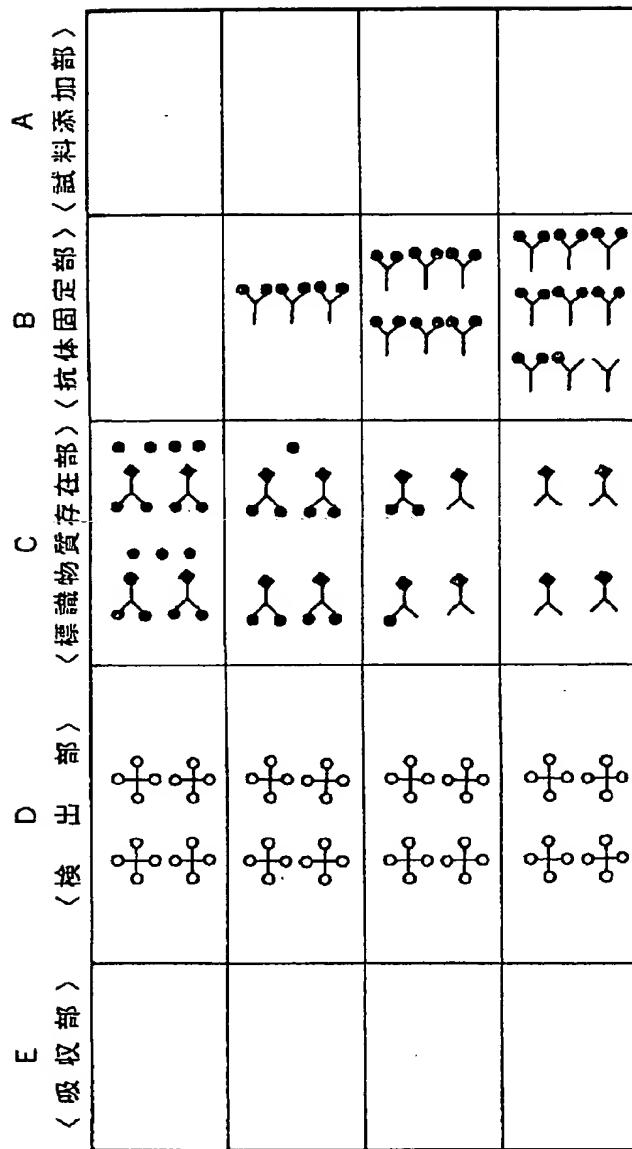
× : 捕足用抗体 VII + : キャリア蛋白 またはカルボキシル基含有
水溶性モノオレフィン系高分子化合物

×○ : 標識抗体 VII

◆ : 標識物

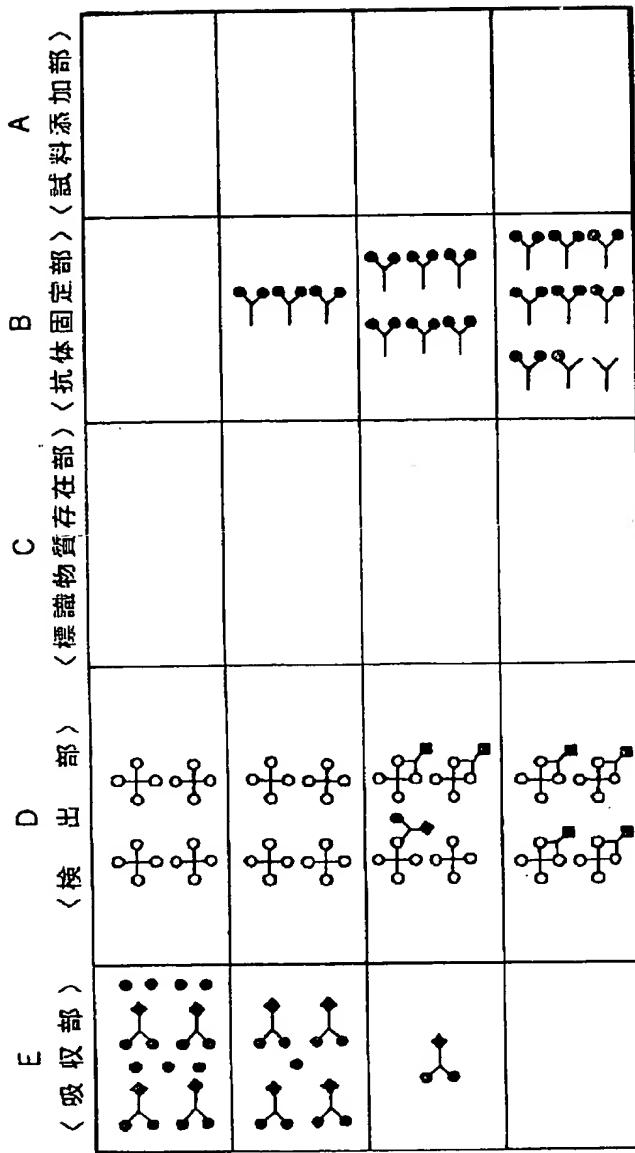
○ : ハブテン またはその化学的変性物

【図8】



- : ハブテン (分析対象物) ○ : 検出用物質
- × : 捕足用抗体 VII
- △ : 標識抗体 VII
- ◆ : 標識物
- : ハブテン またはその化学的変性物
- : キャリア蛋白 またはカルボキシル基含有
水溶性モノオレフィン系高分子化合物

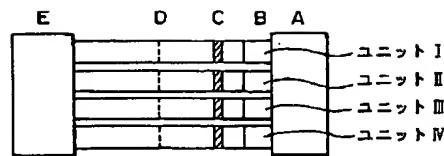
【図9】



- : ハブテン (分析対象物) ○ : 検出用物質
- × : 捕足用抗体 VII
- △ : 標識抗体 VII
- ◆ : 標識物
- : ハブテン またはその化学的変性物
- × : キャリア蛋白 またはカルボキシル基含有
水溶性モノオレフィン系高分子化合物

【図10】

(a)



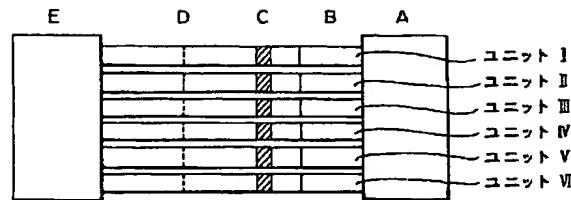
(b)



A : 試料添加部
 B : 抗体固定部
 C : 標識物質存在部
 D : 検出部
 E : 吸収部
 F : クロマト材
 G : 支持体

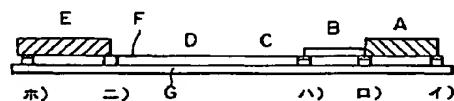
【図11】

(c)



A : 試料添加部
 B : 抗体固定部
 C : 標識物質存在部
 D : 検出部
 E : 吸収部
 F : クロマト材
 G : 支持体

(d)



イ)、ロ)、ハ)、ホ) の実験の先に両面粘着テープ

【図12】

